Über die Oxydation von Myricitrin durch Peroxydase

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Karl-Günther Heinrici

aus Halle/Saale

1966

Über die Oxydation von Myricitrin durch Peroxydase

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Karl-Günther Heinrici

aus Halle/Saale

1. Referent: Prof. Dr. H. Loth

2. Referent: Prof. Dr. F. Eiden

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Januar 1966

Tag der Promotion: 18. FEB 1966

Diese Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. L o t h durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. L o t h für die Überlassung dieses Themas sowie für seine ständige Bereitschaft, alle Probleme, die sich im Zusammenhang mit dieser Arbeit ergaben, mit mir zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. G. S c h e n c k danke ich für seine freundliche Unterstützung und für sein Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG Seite 1

ALLGEMEINER TEIL 5

Das Spektrum des Myricitrins 5

Änderungen des Spektrums durch Autoxydation 6

Durch fermentative Oxydation des Myricitrins bedingte Änderungen des Spektrums 7

Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Oxydation 9

Reaktion intermediärer Oxydationsprodukte mit Askorbinsäure 10

Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Oxydationsprodukte 15

Vergleichende Untersuchungen mit anderen Oxydationsmitteln 15

Untersuchungen über die Abspaltung von CO_2 während der fermentativen Oxydation 17

Isolierung des Oxydationsproduktes 18

DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE 28

EXPERIMENTELLER TEIL 33

Isolierung von Myricitrin aus Corylus avellana 33

Isolierung von Myricitrin aus Myrica nagi 34

Identifizierung von Myricitrin 35

Ferment und Pufferlösungen 37

Die Oxydation von Myricitrin durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd 38

Dünnschichtchromatographie der Oxydationsprodukte 40

Isolierung des Oxydationsproduktes 42

Untersuchung des Oxydationsproduktes 43

ZUSAMMENFASSUNG 47

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0064

EINLEITUNG

Die Flavonoide sind eine wichtige Gruppe pflanzlicher Phenole. Seit mehr als hundert Jahren sind sie als weitverbreitete Inhaltsstoffe höherer Pflanzen bekannt. Über ihre Funktion im pflanzlichen Organismus besteht noch keine Klarheit. Es ist jedoch bekannt, daß einige Flavonoide als Vorstufen von kondensierten Gerbstoffen anzusehen sind. Unter kondensierten Gerbstoffen versteht man höhermolekulare Verbindungen, die durch Säuren nicht hydrolysierbar sind und die Eigenschaft haben, Eiweiß zu fällen.

Den kondensierten Gerbstoffen kommt in der Pflanze außerordentliche Bedeutung zu, so werden z.B. Kernhölzer und Rinden durch Einlagerung von kondensierten Gerbstoffen vor Fäulnis und Verwesung geschützt. Auch verletzte Gewebe bilden zu ihrem Schutz kondensierte Gerbstoffe. Säurekatalysierte Kondensation und oxydative Polymerisation von Flavonoiden können zu höhermolekularen Verbindungen mit Gerbstoffeigenschaften führen. Während FREUDENBERG und Mitarbeiter (1) über die Kondensation von Catechinen unter der Einwirkung von Säure und Wärme arbeiteten, untersuchten HATHWAY und Mitarbeiter (2), (3) die Polymerisation durch enzymatische Oxydation und autoxydative Vorgänge.

In der Lebensmittel- und Tabakindustrie spielen die kondensierten Gerbstoffe eine Rolle, so sind z.B. Geschmack und Aroma des schwarzen Tees, des Kakaos und des Tabaks von der stark variierenden Zusammensetzung der kondensierten Gerbstoffe abhängig.

O.TH.SCHMIDT (4) hat die oxydative Dimerisierung der Gallussäure zur Ellagsäure untersucht. Diese Reaktion wird in Pflanzen durch oxydierende Fermente katalysiert, was schon DUQUENOIS (5) vermutete.

Reaktionen mit Peroxydase sind an das Vorhandensein von Wasserstoffperoxyd gebunden, das als Nebenprodukt bei der Reaktion einiger anderer Fermente, so z.B. der der Glukoseoxydase und der Aminosäureoxydase entsteht. Angriffspunkte für peroxydasekatalysierte Oxydationen mit Wasserstoff-

peroxyd stellen phenolische Hydroxylgruppen dar, soweit sie nicht substituiert sind. Dementsprechend kann eine große Anzahl von Phenolen der Peroxydase als natürliches Substrat dienen. Erwähnt seien hier nur Flavane, Anthocyane, Flavone, Flavonole und Gallussäurederivate.

Spezielle Untersuchungen über peroxydasekatalysierte Oxydationen von Flavonen und Flavonolen sind in der Literatur bisher nur selten erwähnt worden. NEUBERG und KOBEL (6) sowie MIKHAILOV (7) machen Veränderungen des Rutins für die dunkle Farbe des Tabaks mitverantwortlich. LOTH (8) untersuchte die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd und Peroxydase auf Rutin (Abb.1).

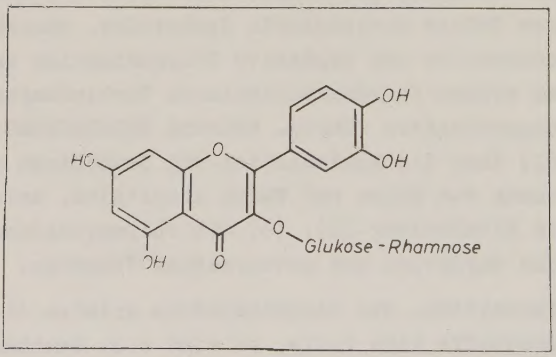


Abb. 1: Rutin

Er konnte nachweisen, daß die Reaktion über eine Chinon-Zwischenstufe zu höhermolekularen, braungefärbten Produkten verläuft. LOTH und KLINGE (9) zeigten, daß bei der durch Peroxydase katalysierten Oxydation von Kämpferol-3-glukosid (Abb.2) polymere Produkte entstehen, die über oligomere Zwischenprodukte gebildet werden. Eine Chinon-Zwischenstufe konnte in diesem Fall nicht festgestellt werden.

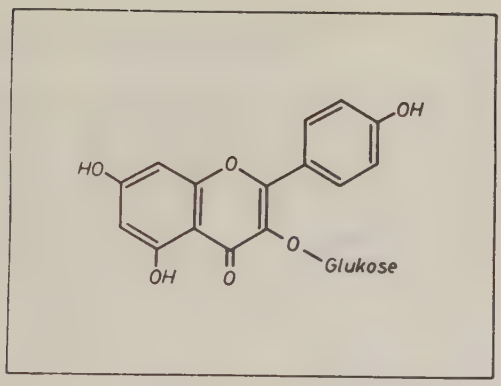


Abb. 2: Kämpferol-3-Glukosid

Im Zusammenhang mit den letztgenannten Arbeiten war es von großem Interesse, nach dem im Seitenring einfach hydroxylierten Kämpferol und dem zweifach hydroxylierten Quercetin nun ein dreifach hydroxyliertes Flavonol, das Myricetin, zu untersuchen (Abb.3).

Myricetin ist ein 3,5,7,3',4',5' Hexahydroxyflavon, das in Form mehrerer Glykoside, hauptsächlich aber als Myricitrin, dem 3-Rhamnosid des Myricetins, in der Pflanzenwelt außerordentlich verbreitet ist.

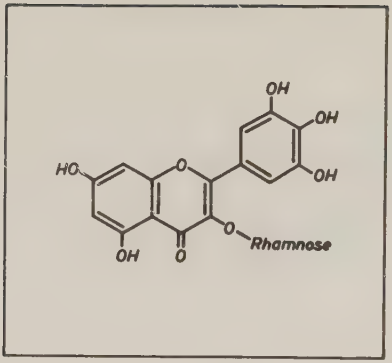


Abb. 3: Myricitrin

Für die Untersuchungen über die fermentative Oxydation benutzten wir das wasserlösliche Glykosid, da fermentative Reaktionen nur in wässeriger Lösung ablaufen.

ALLGEMEINER TEIL

1.) Das Spektrum des Myricitrins

Myricitrin weist eine Lichtabsorption auf, wie sie für alle Flavonolglykoside charakteristisch ist und deren Banden vom Lösungsmittel und pH-Wert beeinflußt werden. Das Spektrum wurde in Methanol und in wässerigen Pufferlösungen bestimmt. Die Spektren im sauren Bereich zwischen pH 3 und pH 6 sind untereinander gleich, während bei pH 7 eine bathochrome Verschiebung auftritt. (Abb.4) Das kurzwellige Maximum ist scharf und schmal, während sich das langwellige Maximum über 4 nm hinzieht. Das Spektrum in Methanol ist dem in saurer wässeriger Pufferlösung weitestgehend ähnlich.

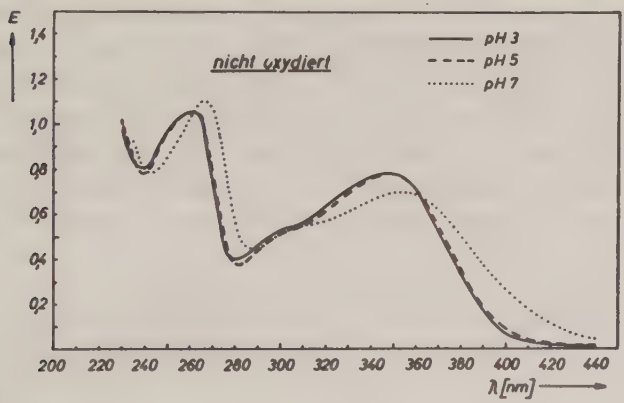


Abb. 4: Das Spektrum des Myricitrins in wässerigen Pufferlösungen. Konzentration: 5 µMol/loo ml.

Eine Übersicht vermittelt die Abbildung 4, die Meßwerte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die in der Tabelle angeführten Meßwerte, sowie sämtliche Kurven entsprechen einer Konzentration von 5 µMol/loo ml, die im folgenden stets benutzt wurde.

		saurer Bereich pH 3 - 6		beim pH 7	
Maxima	λ (nm)	262	347	265	353
	ε (L/Mol·cm)	$2{,}1 \cdot 10^4$	$1{,}54 \cdot 10^4$	$2{,}2 \cdot 10^4$	$1{,}4 \cdot 10^4$
	E (C=5 µMol/100)	1,05	0,77	1,10	0,7
Minima	λ (nm)	239	280	242	287

Tabelle 1: Maxima und Minima des Myricitrinspektrums in wässerigen Pufferlösungen.

2.) Änderungen des Spektrums durch Autoxydation

Läßt man methanolische Lösungen oder aber wässerige Pufferlösungen von pH 3 bis pH 7, die Myricitrin in der von uns benutzten Konzentration enthalten, bei Raumtemperatur längere Zeit stehen, so verändert sich das Spektrum: Unterhalb von 390 nm verringert sich die Extinktion gegenüber einer frischen Lösung. Von 390 bis 450 nm wird die Extinktion geringfügig höher. Diese Änderungen des Spektrums sind bereits nach 24 Stunden feststellbar (Abb.5) Eine Lagerung der Myricitrin-Stammlösung ist also nicht möglich.

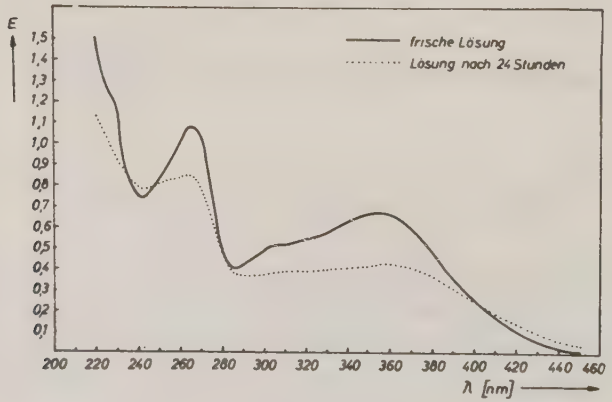


Abb. 5: Lösung von 5 µMol Myricitrin in 100 ml Methanol. Die Spektren wurden kurz nach der Herstellung der Lösung und 24^h später gemessen

Im Verlauf von 2 Stunden treten noch keine meßbaren Veränderungen auf, während die enzymatischen Reaktionen innerhalb von 3o Minuten abgelaufen sind. Die Autoxydation wurde von uns nicht näher untersucht, die hier beschriebenen Messungen sollten lediglich sicherstellen, daß in dem Zeitraum, in dem die enzymatische Oxydation abläuft, unter Einhaltung bestimmter Bedingungen eine autoxydative Veränderung des Myricitrins vernachlässigt werden konnte.

3.) Durch fermentative Oxydation des Myricitrins bedingte Änderungen des Spektrums

Ausgehend von den Arbeiten von LOTH am Rutin und LOTH und KLINGE am Kämpferol wurden die oxydativen Veränderungen des Myricitrins spektrophotometrisch untersucht.

Blindversuche, wobei wässerige Pufferlösungen des Myricitrins mit nur einem Partner des Oxydationssystems, nämlich entweder mit Peroxydase oder mit Wasserstoffperoxyd versetzt wurden, hatten ergeben, daß im Verlauf von 2 Stunden keine meßbaren Veränderungen des Spektrums eintraten.

Die weiteren Versuche wurden mit bestimmten Mengen Wasserstoffperoxyd und Peroxydase durchgeführt. Einem Ansatz von loo ml, der 5 µMol Myricitrin enthielt, wurden jeweils $6{,}9 \cdot 10^{-10}$ Mol Peroxydase und 1 bis 5 Äquivalente Wasserstoffperoxyd zugesetzt. Dabei entsprach 1 Oxydationsäquivalent dem Übergang von 1 Elektron pro Molekül Myricitrin.

Myricitrin wurde im pH-Bereich von 3 bis 7 oxydiert. Dabei wurde die Extinktion beider Maxima gegenüber nicht oxydierten Lösungen erniedrigt, ihre Lage geringfügig verschoben. Die Abbildung 6 zeigt dies für die Reaktionslösung mit dem pH 5, die Kurven für den pH 3 und pH 7 verlaufen analog. Das langwellige wie auch das kurzwellige Maximum verschwinden nach vollständiger Oxydation durch 2 Oxydationsäquivalente. Im Bereich des kurzwelligen Maximums tritt nach vollständiger Oxydation eine Schulter auf, deren Lage und Breite von dem pH-Wert abhängt, bei dem oxydiert wurde. Im

Wellenbereich von 4oo bis 45o nm ist die Extinktion gegenüber nicht oxydierten Lösungen geringfügig erhöht.

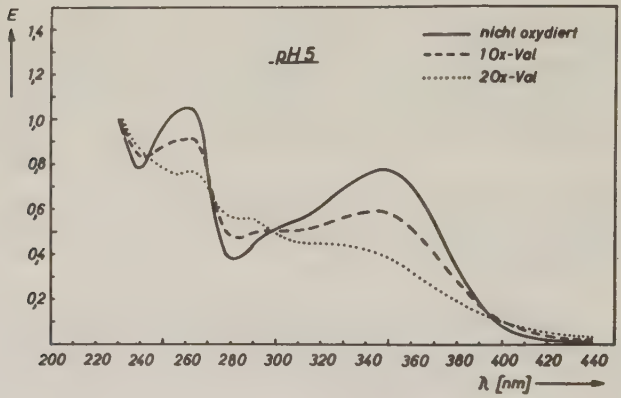


Abb. 6: Spektren der Reaktionslösungen nach fermentativer Oxydation des Myricitrins bei pH 5. Aufgenommen 1 Stunde nach Start der Reaktion

Die Absorptionsspektren der Reaktionslösungen nach erfolgter Oxydation durch 2 Oxydationsäquivalente zeigt Abbildung 8.

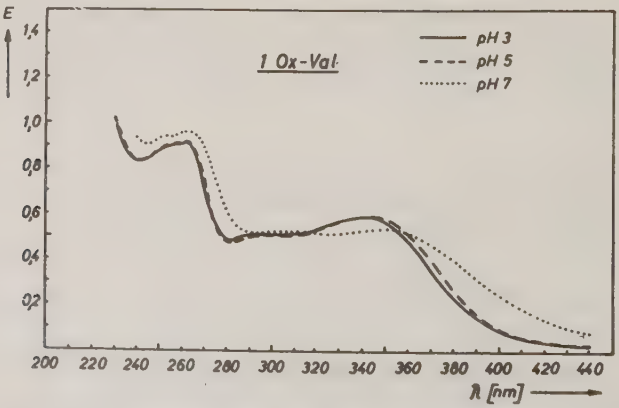


Abb. 7: Absorptionsspektren der Reaktionslösungen, die nach Oxydation durch 1 Äquivalent Wasserstoffperoxyd erhalten wurden. Spektrum 1 Stunde nach Start der Reaktion

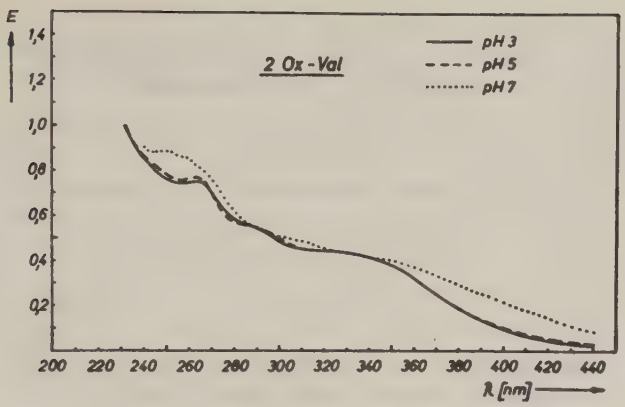


Abb. 8: Absorptionsspektren der Reaktionslösungen, die nach vollständiger Oxydation durch 2 Äquivalente Wasserstoffperoxyd erhalten wurden. Aufgenommen 1 Stunde nach Start der Reaktion

Die bei pH 4 und pH 6 erhaltenen Kurven verlaufen zwischen den dargestellten und wurden weggelassen, um die Übersicht zu erleichtern. Während die Kurven für pH 3 und pH 5 einander stark ähneln, zeigt das Absorptionsspektrum der Reaktionslösung beim pH 7 noch eine deutliche bathochrome Verschiebung (Abb.7 u. 8). Nach Zusatz von 3 und mehr Oxydationsäquivalenten erhielten wir Spektren, die gegenüber den mit 2 Oxydationsäquivalenten erhaltenen Spektren nur noch Unterschiede erkennen ließen, die innerhalb der Meßgenauigkeit lagen.

4.) Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Oxydation

Bei den pH-Werten 3 und 4 wurde der zeitliche Verlauf der enzymatischen Oxydation des Myricitrins beobachtet. Gemessen wurden die Veränderungen im langwelligen und im kurzwelligen Maximum nach Zusatz von 1 und 2 Äquivalenten Wasserstoffperoxyd. Sofort nach Zugabe des Fermentes erfolgt ein steiler Abfall der Extinktion, der langsam schwächer wird und je nach der Menge des zugesetzten Wasserstoffperoxyds auf einer bestimmten Höhe zum Stillstand kommt.

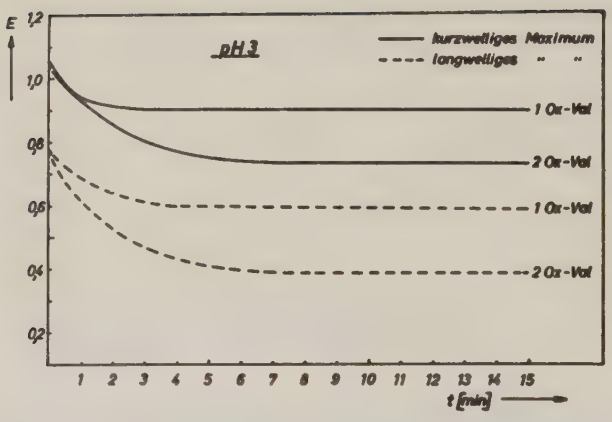


Abb. 9: Extinktionsabfall bei der enzymatischen Oxydation des Myricitrins in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Abbildung 9 gibt dieses Verhältnis für den pH 3 wieder. Beim pH 4 entstehen analoge Kurven, nur findet in diesem Fall bereits nach 5 Minuten kein Extinktionsabfall mehr statt. Die Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Oxydation bei pH 5, pH 6 und pH 7 war nicht möglich, da die Reaktion mit steigendem pH-Wert schneller verläuft und bei pH 5 bereits nach etwa 4 min. beendet ist. Eine so hohe Reaktionsgeschwindigkeit ist mit den hier verwendeten Methoden nicht mehr exakt zu verfolgen.

5.) Reaktion intermediärer Oxydationsprodukte mit Askorbinsäure

LOTH konnte auf spektrophotometrischem und chromatographischem Wege zeigen, daß bei der fermentativen Oxydation des Rutins Intermediärprodukte entstehen, die sich durch Reduktionsmittel wie Askorbinsäure wieder zum Rutin reduzieren lassen (10). Diese Reduzierbarkeit ließ in Verbindung mit anderen experimentellen Befunden auf intermediär gebildete Chinone schließen.

In entsprechender Weise wurde versucht, ob im Verlauf der

Oxydation des Myricitrins Verbindungen entstehen, die durch Askorbinsäure reduzierbar sind. Die Versuche wurden bei pH 3 und pH 4 durchgeführt. Einer Myricitrinlösung wurden 2 Oxydationsäquivalente Wasserstoffperoxyd zugefügt. Nach Einsetzen der Reaktion durch Zugabe von Peroxydase wurden in Abständen von je 3o sec. der Reaktionslösung Proben entnommen und mit einem gleichen Volumen Askorbinsäurelösung vermischt. Die Askorbinsäure befand sich in einem Überschuß von loo Reduktionsäquivalenten gegenüber 2 Äquivalenten Wasserstoffperoxyd. Diese Proben wurden dann im Spektralphotometer auf ihre Extinktion im langwelligen Maximum geprüft. Die erhaltenen Werte wurden verdoppelt und mit den zu entsprechenden Zeiten gemessenen Extinktionen nicht reduzierter Lösungen verglichen.

Eine Messung der Extinktionen im kurzwelligen Maximum war nicht möglich, da hier die Askorbinsäure, bzw. ihre Oxydationsprodukte eine starke Eigenabsorption aufweisen.

Auf diese Weise erhielten wir eine Kurve, die die Extinktionsabnahme bei der Oxydation des Myricitrins wiedergibt, und eine zweite Kurve, die bis zum Abschluß der Reaktion höhere Extinktionswerte aufweist (Abb.10 u. 11). Diese höheren Werte werden durch Reduktion bestimmter Intermediärprodukte durch Askorbinsäure erhalten. Die ΔE-Kurve ergibt sich als Differenz aus diesen beiden Kurven. Wie spätere chromatographische Untersuchungen zeigten, wird bei der Reduktion durch Askorbinsäure Myricitrin zurückgebildet. Die ΔE-Kurve ist ein Maß für die zum jeweiligen Reaktionszeitpunkt vorhandene Menge an reduzierbaren Intermediärprodukten.

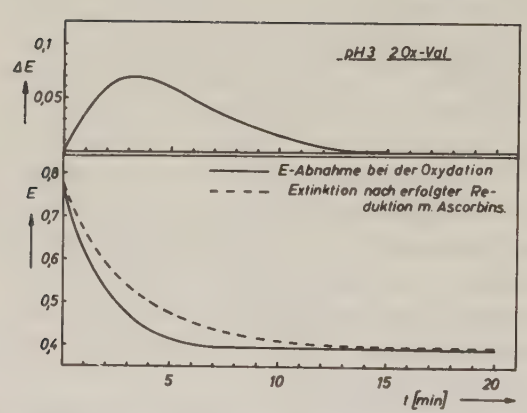


Abb. 10: ΔE-Kurve für pH 3, aufgenommen im langwelligen Maximum bei 347 nm

Die Maxima der ΔE-Kurven zeigen, daß die größte Menge an reduzierbaren Intermediärprodukten etwa 3 min nach Beginn der fermentativen Oxydation vorliegt, im weiteren Verlauf der Reaktion nimmt diese Menge schnell ab.

Dieselben Verhältnisse wurden auch dünnschichtchromatographisch untersucht, um sicherzustellen, daß im Verlauf der Reduktion tatsächlich Myricitrin zurückgebildet wird.

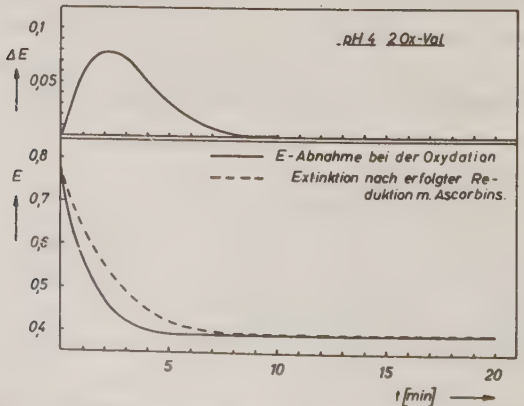
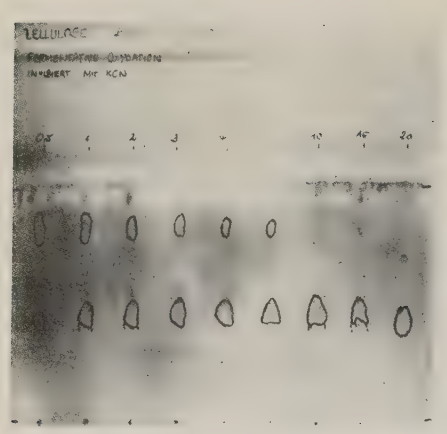


Abb. 11: Δ E-Kurve für pH 4, aufgenommen im langwelligen Maximum bei 347 nm

Da die Puffersubstanzen sich auf dem Dünnschichtchromatogramm störend bemerkbar machten, wurde in ungepufferter Lösung gearbeitet. Die Reaktionslösung wurde durch Zugabe von verdünnter Essigsäure auf pH 3 eingestellt. In Abständen von 1 Minute wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen und die fermentative Oxydation durch Zusatz von Kaliumcyanidlösung inhibiert. Ein zeitlicher Vergleich zwischen den spektrophotometrischen und den dünnschichtchromatographischen Ergebnissen dieser Untersuchungen ist nicht möglich, da für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wesentlich höhere Konzentrationen an Myricitrin und Peroxydase-Wasserstoffperoxyd benutzt wurden, um die aufzutragenden Lösungsmittelmengen möglichst gering zu halten. Diese Proben wurden auf Zellulose-Dünnschichtplatten chromatographiert.

Auf dem Dünnschichtchromatogramm läßt sich nach 1o min. kein Myricitrin mehr nachweisen. Dementsprechend nimmt die Menge des Oxydationsproduktes zu, die sich nach 1o min. ebenfalls nicht mehr verändert (Abb.12).

Wird zu den jeweils gleichen Zeiten den der Reaktionslösung entnommenen Proben Askorbinsäure zugesetzt, so ergeben sich Myricitringehalte, wie sie nach den spektrophotometrischen Untersuchungen zu erwarten waren. Durch die erfolgte Reduktion entsteht wieder Myricitrin, das auch 2o min. nach Reaktionsbeginn noch nachweisbar ist (Abb.13). Dementsprechend kann also der bei der spektrophotometrischen Untersuchung beobachtete Extinktionsanstieg als Rückbildung von Myricitrin gedeutet werden.

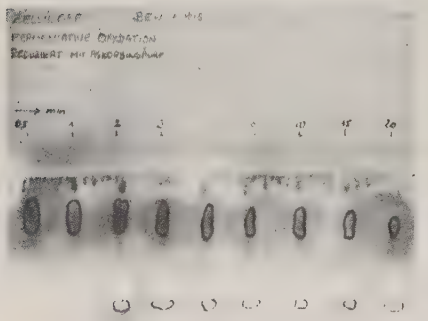


Reaktionszeit (min.)

Myricitrin

Oxydationsprodukt

Abb. 12: Oxydation des Myricitrins
Dünnschichtchromatogramm einer Reaktionslösung mit 2 Äquivalenten Wasserstoffperoxyd; nach angegebener Reaktionszeit aliquote Mengen entnommen und mit Kaliumcyanid inhibiert



Reaktionszeit (min.)

Myricitrin

Oxydationsprodukt

Abb. 13: Oxydation des Myricitrins mit 2 Äquivalenten Wasserstoffperoxyd und anschließende Reduktion. Nach den angegebenen Reaktionszeiten aliquote Mengen entnommen und mit Askorbinsäure reduziert

6.) Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Oxydationsprodukte

a.) Untersuchung der Oxydationsprodukte in Abhängigkeit von der Menge des Oxydationsmittels

Um überblicken zu können, welche Produkte bei der Oxydation des Myricitrins auftreten, wurden oxydierte Lösungen chromatographisch untersucht.

Für die chromatographischen Untersuchungen wurden höhere Konzentrationen verwendet als für die Spektralphotometrie, um die aufzutragenden Lösungsmittelmengen möglichst gering zu halten. Es zeigte sich, daß unter den von uns gewählten Bedingungen nur ein Oxydationsprodukt nachweisbar ist. Selbst bei Zugabe von mehr als 5 Äquivalenten Wasserstoffperoxyd entstanden keine Produkte, die am Startpunkt zurückblieben. Wurden der Reaktionslösung weniger als 2 Oxydationsäquivalente zugesetzt, ließ sich auch nach Beendigung der Reaktion noch Myricitrin nachweisen. Dieser Rest von Myricitrin verschwand, wenn erneut Wasserstoffperoxyd zugesetzt wurde. Ein zweites Oxydationsprodukt ließ sich auch bei dieser Variation der Versuchsbedingungen nicht nachweisen.

Um einen möglichen Einfluß der Puffersubstanzen auszuschließen, wurde schließlich die Oxydation in ungepufferter Lösung ausgeführt. Auch dabei entstand nur das Produkt, das bei der Oxydation in wässerigen Pufferlösungen im pH-Bereich von 3 bis 7 stets auftrat.

b.) Vergleichende Untersuchungen mit anderen Oxydationsmitteln

Angeregt durch eine Veröffentlichung von IMAGAWA und TAKINO (11), die Myricitrin mit Polyphenoloxydase und mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert hatten, interessierte es uns, ob das von den genannten Autoren isolierte Oxydationsprodukt mit dem Produkt identisch ist, das bei der Einwirkung von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd auf Myricitrin entsteht.

Bei der Oxydation des Myricitrins mit Kaliumhexacyanoferrat (III) in wässeriger, ungepufferter Lösung entstanden zwei Produkte, von denen das eine mit den von uns verwendeten Laufmittelgemischen den gleichen Rf-Wert zeigte, wie das Produkt, das bei der fermentativen Oxydation mit Wasserstoffperoxyd und Peroxydase entsteht (Abb.14).

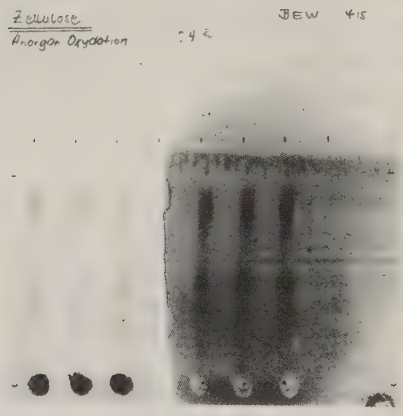


Abb. 14: Dünnschichtchromatogramm einer mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydierten Myricitrinlösung, von der verschiedene Mengen aufgetragen wurden. Sprühmittel auf der linken Plattenseite Eisen(III)-chlorid, auf der rechten Plattenseite bisdiazotiertes Benzidin

Die Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) verlief unter den von uns gewählten Bedingungen stets so, daß eine Restmenge Myricitrin nicht oxydiert wurde. Auch bei Anwendung von drei Oxydationsäquivalenten Kaliumhexacyanoferrat(III) ließ sich nach 48 Stunden noch Myricitrin nachweisen. Bei der am Startpunkt zurückbleibenden Substanz handelt es sich um Hexacyanoferrat(II), das sich mit Eisen(III)-chloridlösung intensiv blau färbt.

Da Myricitrin durch Polyphenoloxydase allein nicht oxydiert wird, wurde eine wässerige Myricitrinlösung mit dem System Brenzkatechin-Polyphenoloxydase behandelt, das auch

IMAGAWA und TAKINO (11) benutzt hatten. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab ein Oxydationsprodukt mit dem gleichen Rf-Wert wie das bei der Oxydation mit Wasserstoffperoxyd-Peroxydase entstehende. An der Laufmittelfront wird ein Fleck sichtbar, der von den Oxydationsprodukten des Brenzkatechins herrührt (Abb.15).

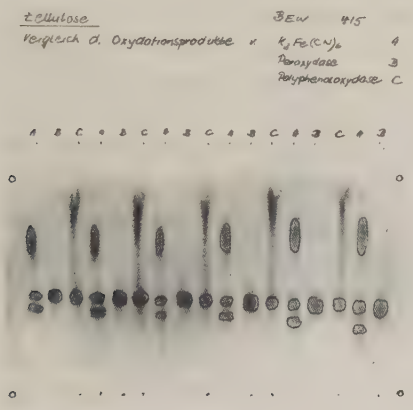


Abb. 15: Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Oxydationsprodukte des Myricitrins nach der Oxydation mit Hexacyanoferrat(III)=A, Peroxydase=B und Polyphenoloxydase=C

7.) Untersuchungen über die Abspaltung von CO_2 während der fermentativen Oxydation

Für die Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit war es wichtig, festzustellen, ob im Verlauf der fermentativen Oxydation mit Peroxydase CO_2 abgespalten wird. Dazu wurde Myricitrin in wässeriger Pufferlösung von pH 3 mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd in einer Warburg-Apparatur oxydiert. Für die Reaktion wurden Gefäße verwendet, in denen etwa gebildetes CO_2 an mit Natronlauge getränkte Filtrierpapierschnitzel gebunden wird. Es wurden drei Gefäße mit und drei Gefäße ohne derartig vorbereitetes Filtrierpapier benutzt. Je nachdem, ob die Schnitzel mit Natronlauge getränkt waren,

oder nicht, mußten an den Manometern Druckdifferenzen auftreten, falls im Verlauf der Oxydation CO_2 entsteht.

An den Manometern traten keine Druckdifferenzen auf. Das Entstehen von CO_2 konnte somit ausgeschlossen werden.

8.) Isolierung des Oxydationsproduktes

Zum Zwecke einer näheren Charakterisierung sollte das Oxydationsprodukt isoliert werden. Zur Vereinfachung der Isolierung wurde die Oxydation in ungepufferter Lösung vorgenommen. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Peroxydase und zwei Äquivalenten Wasserstoffperoxyd in Gang gesetzt.

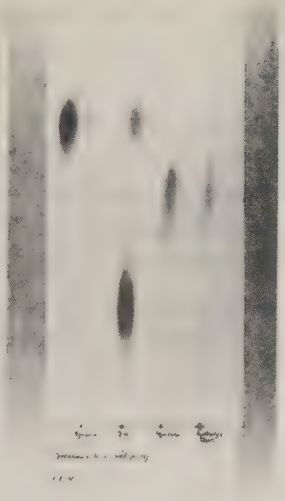
Einige Minuten nach der Fermentzugabe färbte sich der Ansatz dunkelbraun. Die Färbung war nach 2o Minuten in ein beständiges Gelbbraun übergegangen. Nach 6o Minuten wurde das Wasser im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand war eine bräunliche Substanz, die in Methanol aufgenommen wurde. Chromatographische Untersuchungen ergaben Identität mit dem bereits bekannten Oxydationsprodukt. Es gelang nicht, das noch glykosidische Oxydationsprodukt durch Kristallisation zu reinigen. Durch mehrmaliges Umfällen mit Äther aus methanolischen Lösungen erhielten wir ein chromatogrammreines Produkt.

Das Oxydationsprodukt wurde durch einstündiges Erhitzen mit 2%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbad hydrolysiert. Nach dem Erkalten schieden sich aus der Lösung kleine hellbraune Kristalle ab, die mehrfach aus Wasser umkristallisiert wurden. Die durch Umkristallisation gereinigte Substanz bestand aus einem hellgelben Kristallpulver mit einem Schmelzpunkt von 256°C (Kofler).

Das Aglykon des Oxydationsproduktes und das Myricetin zeigten auf dem Papier- wie auch auf dem Dünnschichtchromatogramm den gleichen Rf-Wert (Abb.16). Die Flecke unterschieden sich jedoch durch ihre Fluoreszenz beim Betrachten im UV-Licht: Während der Fleck des Myricetins nach dem Besprühen mit Aluminiumchloridlösung stark gelbgrün fluoresziert,

ist der Fleck des Oxydationsproduktes gelborange und fluoresziert kaum.

Abb. 16:
Papierchromatogramm der Oxydationsprodukte des Myricitrins, am Startpunkt wurden von links nach rechts aufgetragen: Myricitrin, durch Peroxydase oxydierte Reaktionslösung, Myricetin, Aglykon des Oxydationsproduktes. Laufmittel: Essigester, Ameisensäure, Wasser= 1o+3+2.



Mit einem Dampfdruckosmometer wurden mehrere Molekulargewichtsbestimmungen durchgeführt. Es ergaben sich folgende Werte:

1. Molekulargewicht des Aglykons des Oxydationsproduktes in Azeton: 695. Berechnet 643,45
2. Molekulargewicht des azetylierten Oxydationsproduktes in Azeton 1150. Berechnet 1138,9 (12 Azetylgruppen)

Die Elementaranalyse des Aglykons des Oxydationsproduktes ergab folgende Werte:

	% C	% H
1.	55,32	3,37
2.	55,06	3,36

Für ein dimeres Myricetin (2·Myricetin - 2H) $C_{30}H_{18}O_{16}$ errechnet man: 56,79 % C und 2,86 % H.

Um die Anzahl der freien Hydroxylgruppen bestimmen zu können, wurde das Aglykon des Oxydationsproduktes azetyliert. Dazu wurde die Substanz mit Essigsäureanhydrid und Natriumazetat 1 Stunde am Rückflußkühler erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Azetylierungsgemisch mit Wasser versetzt. Das ausgefallene Azetylierungsprodukt wurde mehrfach aus Äthanol umkristallisiert. Es bestand aus weißen Kristallen vom Schmelzpunkt 286°C (Kofler).

Die Elementaranalyse des azetylierten Aglykons des Oxydationsproduktes ergab folgende Werte:

	% C	% H
1.	56,46	3,68
2.	56,61	3,89

Die berechneten Werte für ein dimeres Myricetin mit 12 Azetylgruppen ($C_{54}H_{42}O_{28}$, Molgewicht 1138,9) betragen:

56,95 % C und 3,71 % H

Die Bestimmung der Azetylgruppen wurde einmal nach saurer Hydrolyse und einmal als C-Methylgruppenbestimmung durchgeführt. Die Analysen ergaben folgende Werte:

saure Hydrolyse:	1.	41,95 % CH_3CO
	2.	43,51 % CH_3CO
C-Methyl:	1.	16,98 % CH_3
	2.	15,14 % CH_3

Die berechneten Werte für 12 Azetylgruppen betragen:

45,36 % CH_3CO

und 15,84 % CH_3

Die berechneten Werte für 11 Azetylgruppen betragen:

43,16 % CH_3CO

und 15,09 % CH_3

Das Absorptionsspektrum des glykosidischen Oxydationsproduktes (Abb. 17) ähnelt dem Spektrum der Reaktionslösung nach vollständiger Oxydation durch 2 Äquivalente Wasserstoffperoxyd (Abb. 8). Diese Tatsache war nach den Ergebnissen der dünnschichtchromatographischen Untersuchung zu erwarten, da nach vollständiger Oxydation nur ein Produkt nachzuweisen war.

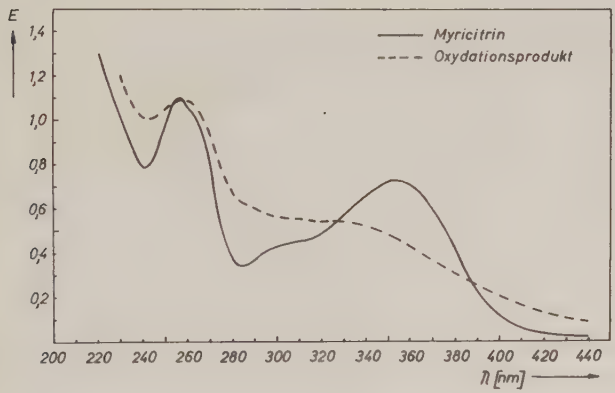


Abb. 17: Absorptionsspektrum des glykosidischen Oxydationsproduktes

Das kurzwellige Maximum ist noch deutlich ausgeprägt, während das langwellige Maximum völlig verschwunden ist. Eine Ähnlichkeit mit dem Absorptionsspektrum des Myricitrins ist kaum noch festzustellen. Dagegen ähnelt das Absorptionsspektrum des Aglykons des Oxydationsproduktes dem des Myricetins sehr stark (Abb.18).

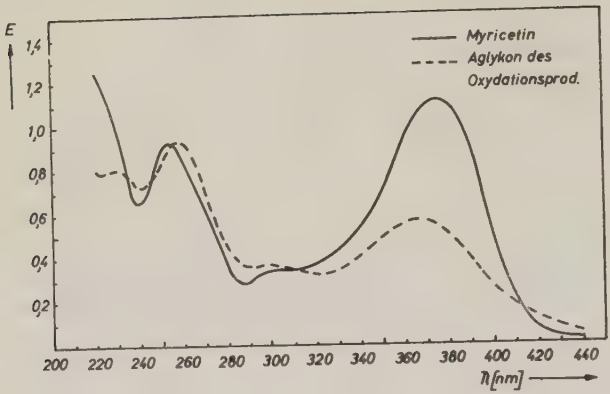


Abb. 18: Absorptionsspektrum des Aglykons des Oxydationsproduktes und des Myricetins

Langwelliges und kurzwelliges Maximum liegen im gleichen Wellenlängenbereich, die Absorption des Aglykons des Oxydationsproduktes im langwelligen Maximum ist größer als die im kurzwelligen, während dieses Verhältnis beim Myricetin umgekehrt ist.

Auf Grund der hier beschriebenen Untersuchungen kann als sicher angenommen werden, daß das bei der fermentativen Oxydation des Myricitrins durch Wasserstoffperoxydase entstehende Produkt ein Dimeres des Myricitrins ist. Um die Verknüpfungsstelle auffinden zu können, wurde das Aglykon des Oxydationsproduktes einem Alkaliabbau unterworfen.

Die Spaltprodukte wurden dünnschichtchromatographisch durch Vergleich mit Testsubstanzen identifiziert. Auf diese Weise läßt sich neben Phloroglucin weder Gallussäure noch Ellagsäure nachweisen (Abb.19).

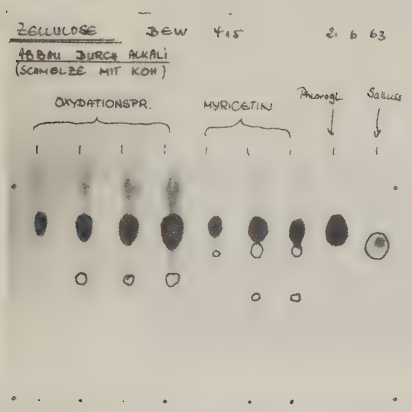


Abb. 19: Dünnschichtchromatogramm der bei der Alkalischmelze des Myricetins und des Aglykons des Oxydationsproduktes entstehenden Produkte, Testsubstanzen.

Auch eine Variation der Versuchsbedingungen des Alkaliabbaus (12),(13) führte nicht zu anderen Ergebnissen (Abb.19, 20, 21).

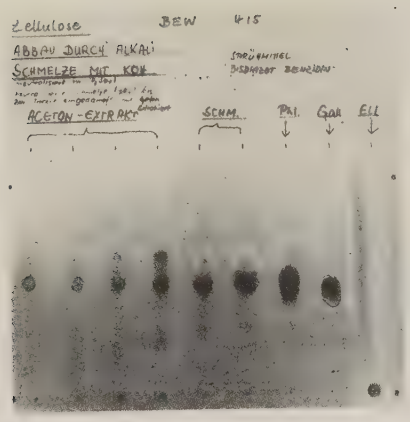


Abb. 20: Alkalischmelze des Aglykons des Oxydationsproduktes; Dünnschichtchromatogramm der Abbauprodukte.
Schm = ätherische Ausschüttelung der Schmelze
Phl. = Phloroglucin, Gall = Gallussäure,
Ell = Ellagsäure

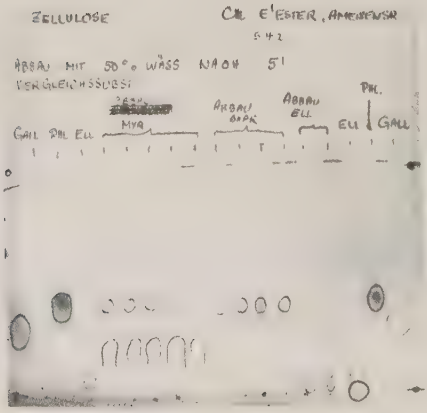


Abb. 21: Abbau des Myricitrins, der Ellagsäure und des Aglykons des Oxydationsproduktes mit wässerigem Alkali; Dünnschichtchromatogramm der Abbauprodukte

Wie der Vergleich der Absorptionsspektren der Aluminiumkomplexe (Abb.22) des Myricitrins und des Oxydationsproduktes zeigt, ist die Fähigkeit zur Komplexbildung beim Oxydationsprodukt voll erhalten geblieben.

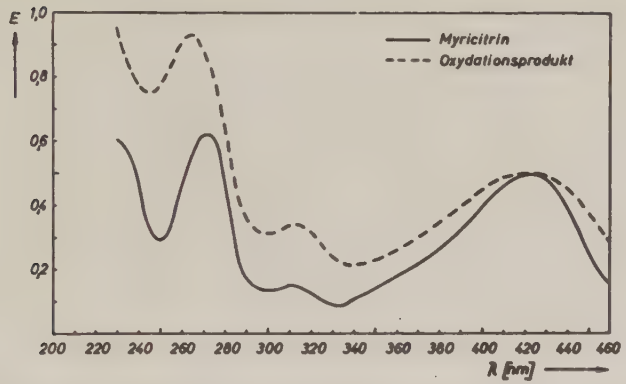


Abb. 22: Vergleich der Absorptionsspektren der Aluminiumkomplexe des Myricitrins und des glykosidischen Oxydationsproduktes

J-R-Spektren

Vom Myricetin, sowie vom Aglykon des Oxydationsproduktes wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektralphotometer 237 die J-R-Spektren in KBr aufgenommen (Abb.23 u.24).

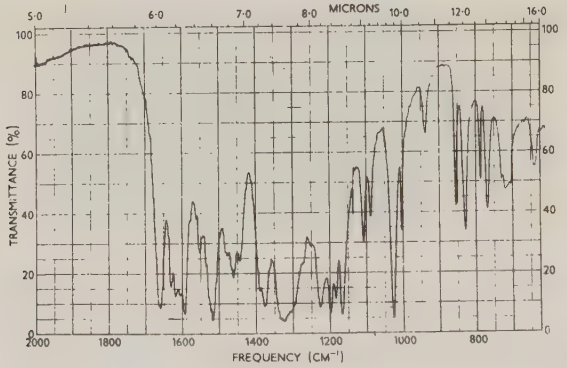


Abb. 23: J-R-Spektrum des Myricetins in KBr. Wellenzahlenbereich von 625 - 2000 CM^{-1}

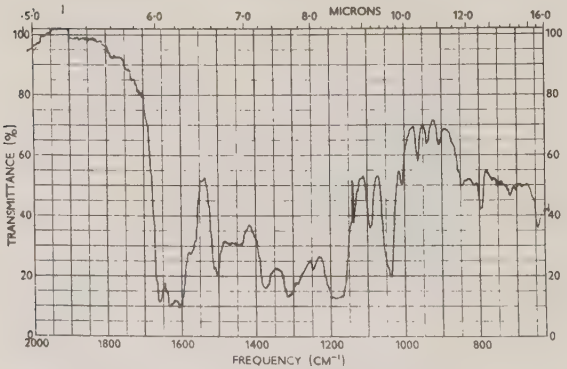


Abb. 24: J-R-Spektrum des Aglykons des Oxydationsproduktes in KBr. Wellenzahlenbereich von 625 - 2000 CM^{-1}

Beide Spektren zeigen übereinstimmend die Carbonylbande bei 1660 CM^{-1}. Die Spektren im Wellenzahlenbereich über 2000 CM^{-1} sind hier nicht wiedergegeben; sie zeigen lediglich die Hydroxylbanden bei 3000 - 3500 CM^{-1}.

DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

Die fermentative Oxydation des Myricitrins erfolgt in mehreren aufeiander folgenden Reaktionsschritten. Der erste Schritt besteht aus einer Dehydrierung von phenolischen Hydroxylgruppen, die zu einer Chinonbildung führt. Unter den von uns gewählten Bedingungen sind Hydroxylierungen nicht denkbar. Eine Folgereaktion der in wässeriger Lösung außerordentlich instabilen Chinone führt zu einem stabilen, dimeren Produkt, das unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Wasserstoffperoxyd und Peroxydase nicht mehr angegriffen wird (Abb.25).

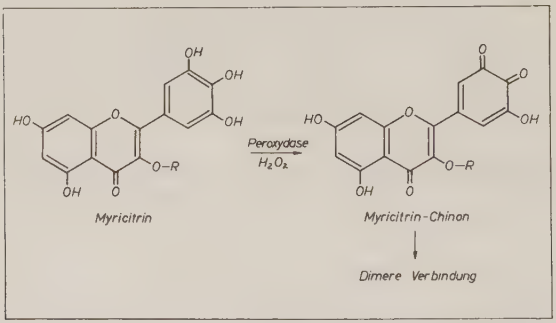


Abb. 25: Raktionsschema der Oxydation des Myricitrins durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd

Es soll nun gezeigt werden, inwieweit sich der hier skizzierte Reaktionsverlauf an Hand der Untersuchungsergebnisse nachweisen läßt.

Wie JURD (14) zusammenfassend beschreibt, werden Lage und Intensität beider Maxima des Flavonspektrums durch die Anzahl und Anordnung der Hydroxylgruppen bestimmt. Eine Veränderung der Anzahl der Hydroxyle prägt sich dementsprechend in einer Änderung der Lage und der Intensität der Maxima aus.

Die Dissoziation der phenolischen Hydroxyle bewirkt eine

bathochrome Verschiebung der Maxima gegenüber dem sauren Bereich (Abb.4). Im Verlauf der Oxydation des Myricitrins mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd erfolgt eine Extinktionserniedrigung und Verschiebung der Maxima. Die größte Extinktionserniedrigung erfolgt nach Zugabe von 2 Oxydationsäquivalenten, also nachdem der Ausgangssubstanz 2 Elektronen entzogen wurden (Abb.6 und 8). Die Dehydrierung von 2 Hydroxylgruppen führt zur Oxydationsstufe eines Chinons. Eine Zugabe von größeren Mengen Wasserstoffperoxyd bewirkt keine weitere Extinktionsabnahme. Nach Zugabe von weniger als 2 Oxydationsäquivalenten läßt sich auf chromatographischem Wege noch Myricitrin nachweisen.

Diese Beobachtungen erlauben den Schluß, daß das erste, wenn auch nicht direkt faßbare Intermediärprodukt der enzymatischen Oxydation eine Substanz von der Oxydationsstufe eines Chinons ist.

Die Reduktion gewisser Intermediärprodukte mit Askorbinsäure verläuft unter Extinktionserhöhung, d.h. unter Rückbildung phenolischer Hydroxylgruppen. Wie chromatographisch nachgewiesen wurde, wird bei dieser Reduktion auch tatsächlich Myricitrin zurückgebildet. Diese Befunde sprechen für das Vorliegen einer Chinongruppierung, die im Falle des Myricitrins nur als o-Chinon im Seitenring lokalisiert sein kann. Die Unbeständigkeit von o-Benzochinonen in wässeriger Lösung ist bekannt, es erfolgt im allgemeinen eine Stabilisierung solcher Verbindungen durch Polymerisation. Wie das isolierte Oxydationsprodukt zeigt, erfolgt die Stabilisierung des gebildeten Myricitrin-Chinons durch Bildung eines Dimeren. Diese Folgereaktion verläuft schnell und ist außerordentlich pH-abhängig (Abb.10 und 11). Da die Geschwindigkeit der Extinktionsabnahme mit steigendem pH-Wert immer größer wird, konnte sie mit der beschriebenen Methode nur bei pH 3 und pH 4 gemessen werden. Die Feststellung, daß das gebildete Oxydationsprodukt gegen einen Überschuß an Oxydationsmittel stabil ist, wirft die Frage auf, wie diese Stabilität zustande kommt.

Eine Erklärung wäre die Bildung eines Purpurogallinderivates. HORNER und DÜRCKHEIMER (15) haben den Reaktionsmecha-

nismus der Purpurogallinbildung in ihren Untersuchungen über die o-Chinone aufgeklärt. Nach ihren Befunden entsteht bei der Dimerisation aus zwei Molekülen 3-Hydroxy-o-chinon ein Addukt mit einer Endocarbonylgruppe hoher Labilität, die durch Wasser hydrolytisch aufgebrochen wird. Es entsteht dabei eine vinyloge β-Ketosäure, die spontan decarboxyliert. Unsere Versuche, im Verlauf der fermentativen Oxydation des Myricitrins CO_2-Bildung nachzuweisen, führte zu einem negativen Ergebnis. Im übrigen ist gerade nach den Befunden von HORNER und DÜRCKHEIMER bei der beim Myricitrin vorliegenden Anordnung der Substituenten im Ring B eine Tropolonbildung nicht möglich.

Ein Vergleich der Absorptionsspektren des Myricetins und des Aglykons des Oxydationsproduktes (Abb.18) zeigt so geringe Unterschiede, daß angenommen werden kann, daß die Grundstruktur des Myricetins erhalten geblieben ist. Dafür sprechen auch die J-R-Spektren des Myricetins und des Aglykons des Oxydationsproduktes (Abb.23 u. 24). Beide Spektren zeigen übereinstimmend eine Carbonylbande bei 1660cm^{-1}, die in dieser Lage für Flavonole typisch ist.

Auch der Vergleich der Absorptionsspektren der Aluminiumkomplexe von Myricitrin und glykosidischem Oxydationsprodukt sagt aus, daß die Komplexbildungsfähigkeit voll erhalten geblieben ist. (Abb.22) Die Fähigkeit zur Bildung des Aluminiumkomplexes beruht auf der 4-Keto-5-hydroxystruktur des Flavons. Allerdings sind auch Flavonole, d.h. Verbindungen mit einer 4-Keto-3-hydroxystruktur zu einer ähnlichen Komplexbildung befähigt. Der letztgenannte Komplex kann sich jedoch in solchen Fällen nicht bilden, in denen, wie beim Myricitrin und beim glykosidischen Oxydationsprodukt, die Hydroxylgruppe am C-Atom 3 durch einen Zucker geschützt ist. Wenn im Verlauf der Oxydation Hydroxylgruppen verlorengegangen sein sollten, handelt es sich mit Sicherheit nicht um die C-5-Hydroxylgruppe.

Für diese Schlußfolgerung spricht auch der Alkaliabbau des Oxydationsproduktes, bei dem Phloroglucin entsteht. (Abb.19, 20 und 21)

IMAGAWA und TAKINO (11) konnten ein Oxydationsprodukt des Myricitrins nach der Oxydation mit Polyphenoloxydase und Überträger isolieren, dem sie die Struktur eines 2'- 2'''-Dimyricitrins gaben. Die genannten Autoren stützen das Ergebnis ihrer Strukturaufklärung unter anderem auf den nach der Alkalischmelze erfolgten Nachweis von Hexamethoxydiphensäurederivaten. Wir haben zum Abbau das nicht methylierte Oxydationsprodukt benutzt. Es gelang uns in keinem Fall, Abkömmlinge der Hexahydroxydiphensäure nachzuweisen. Hexahydroxydiphensäure kondensiert in wässerigem Medium unter Einfluß von H-Ionen zu Ellagsäure. (5) Diese Kondensation müßte beim Ausschütteln der Abbauprodukte aus saurer Lösung eintreten.

Wir haben Testversuche durchgeführt, ob Ellagsäure nach dem Kochen in wässerigem Alkali unter unseren Versuchsbedingungen nachweisbar ist. Wir konnten feststellen, daß die Ellagsäure durch Schmelzen in Alkali zerstört wird, daß aber nach fünfminütigem Kochen in 5o %iger wässeriger Kalilauge Ellagsäure nachweisbar bleibt.

Wie die Molgewichtsbestimmung zeigt, ist das isolierte Oxydationsprodukt ein Dimeres des Myricitrins, nach den Ergebnissen der Azetylgruppenbestimmung besitzt es noch mindestens 11, wahrscheinlich aber 12 Hydroxylgruppen.

Aus den angeführten Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Verknüpfung des Oxydationsproduktes zwischen den Seitenringen eingetreten sein muß, da ein freier Seitenring bei einem Alkaliabbau als Gallussäure nachweisbar ist, wie der Abbau des Myricetins (Abb.19) zeigt. Beim Abbau des Oxydationsproduktes ist jedoch keine Gallussäure, sondern nur Phloroglucin nachweisbar.

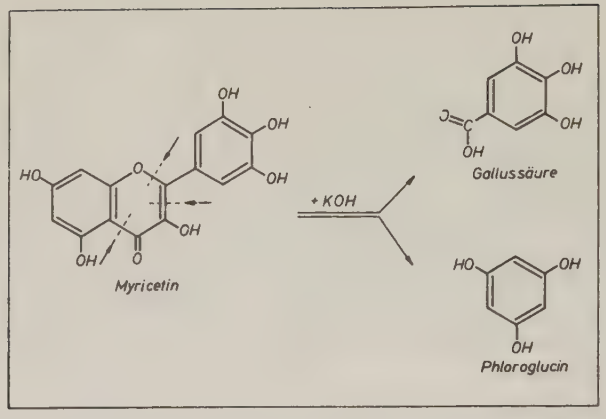


Abb. 26: Schema der Alkalispaltung des Myricetins

EXPERIMENTELLER TEIL

1.) Isolierung von Myricitrin aus Corylus avellans

a.) Extraktbereitung

1953 veröffentlichten HÄNSEL und HÖRHAMMER eine vergleichende Untersuchung über die Flavonglykoside der Betulaceen. (16) Aus einer Reihe von Betulaceen wurde Myricitrin isoliert. Die Blätter von Corylus avellana erschienen uns für eine Isolierung von Myricitrin in größeren Mengen geeignet. Das Hauptglykosid in diesen Blättern ist Myricitrin, das hier von zwei Nebenglykosiden begleitet ist.

Die getrockneten Blätter wurden in Portionen von je 5oo g im Siccotopf mit je 2 l Methanol etwa 1 Stunde auf dem Wasserbad erwärmt. Die Extraktion wurde bei verschlossenem Deckel unter Einhaltung einer Temperatur von höchstens 7o°C vorgenommen. Nach Filtration erhielten wir einen dunkelbraunen Extrakt, der unter vermindertem Druck bis zur Sirupdicke eingeengt wurde. Dieser Sirup wurde 2 mal mit je 2oo ml heißem Wasser digeriert und noch heiß auf einer Filternutsche abgesaugt. Das Chlorophyll schied sich dabei als dunkle Paste ab. Wir erhielten so eine klare hellbraune Lösung, die weiterverarbeitet wurde.

b.) Isolierung durch Säulenchromatographie

Die wässerige Flavonlösung wurde zur weiteren Reinigung und zur Auftrennung auf Polyamidsäulen chromatographiert. Zum ersten Schritt, der Reinigung, wurde ein grobes Polyamidpulver (Ultramid K 228 BM2) +) mit Wasser in ein Chromatographierohr von 5 cm Weite bis zu einer Höhe von 35 cm eingeschlämmt.

4oo ml der Flavonlösung (=5oo g Droge) wurden sodann vorsichtig auf die Säule gebracht und mit etwa 2 L Wasser ge-

---

+) Wir danken der Badischen Anilin- und Sodafabrik für die freundliche Überlassung

waschen. In dem ablaufenden Wasser, das durch einen nicht untersuchten Farbstoff hellbraun gefärbt war, befanden sich keine Flavonole.

Anschließend wurden die Säulen mit Methanol eluiert, wobei sich die Flavone ablösten. Im oberen Teil der Säule verblieben dunkelbraun gefärbte, wahrscheinlich gerbstoffartige Produkte. Die gelbe Flavonlösung wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingedampft. Wir erhielten so aus etwa 2o kg Droge 2oo g eines dunkelgelben Produktes. Chromatographische Untersuchungen ergaben, daß es sich um ein Gemisch mehrerer Flavone handelte.

Dieses Gemisch wurde säulenchromatographisch getrennt. Dazu wurde ein feineres Polyamidpulver (Versuchsprodukt pp 15 Sp) +) mit Wasser in ein Chromatographierohr von 5 cm Weite bis zu einer Höhe von 35 cm eingeschlämmt. Die Säule wurde dann bis zur Verdrängung des Wassers mit Methanol gewaschen. Die methanolgesättigte Säule wurde mit einer Filtrierpapierscheibe abgedeckt und die methanolische Lösung des Flavongemischs (2 g in 2o ml) aus einer Pipette vorsichtig aufgetragen. Nach dem Einsickern der Flavonlösung wurde die Säule mit Methanol eluiert. Bereits nach kurzer Laufzeit wurden mehrere gelbe Zonen erkennbar, deren erste nach etwa 1o Stunden die Polyamidschicht passiert hatte. Die zweite Zone enthielt das Myricitrin. Wie sich bei papierchromatographischen Untersuchungen herausstellte, war die auf der Säule erfolgte Trennung so wenig scharf, daß von jeder Säule nur etwa 1oo ml Eluat erhalten wurde, das ausschließlich Myricitrin enthielt.

Die Gesamtausbeute an Myricitrin aus etwa 2o kg Droge betrug nur 2 g.

2.) Isolierung von Myricitrin aus Myrica nagi

Da die Isolierung von Myricitrin aus den Blättern von Corylus avellana sich als zu umständlich und unergiebig erwies, suchten wir nach einer besser geeigneten Droge, die

---

+) Wir danken der Badischen Anilin- und Sodafabrik für die freundliche Überlassung

möglichst keine anderen Flavonoide enthalten sollte. Unsere Wahl fiel auf die Rinde von Myrica nagi, die jedoch nur in Südostasien heimisch ist.

Wir haben an dieser Stelle Herrn Prof. Fa-Ching Chen von der Universität Taiwan, Formosa, zu danken, der uns 1 kg der getrockneten Rinde zukommen ließ.

Die getrocknete Rinde wurde grob gepulvert und in einer Soxhlet-Apparatur mit Methanol extrahiert. Die erhaltene gelbgraue Lösung wurde unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Wir erhielten auf diese Weise 8o g eines gelbgrauen Pulvers, das in der Hauptsache aus Myricitrin bestand. Das Pulver wurde mehrfach aus heißem Wasser umkristallisiert. Wir erhielten 2o g chromatogrammreines Myricitrin, das sich von der aus Corylus-Blättern erhaltenen Präparation nicht unterschied.

3.) Identifizierung von Myricitrin

Das Schmelzintervall, bestimmt mit dem KOFLER-Heiztischmikroskop, lag bei 194 - 197°C. HÄNSEL und HÖRHAMMER gaben 194°C an. (16)

Der Kristallwassergehalt wurde durch Konstanttrocknen in der Trockenpistole bestimmt. Als Trocknungsmittel diente Phosphorpentoxyd. Das Myricitrin wurde in ein Mikrowägefläschen mit eingeschliffenem Deckel eingewogen. Die Wägungen erfolgten bei geschlossenem Deckel.

	1. Versuch	2. Versuch
Einwaage	3,746 mg	27,o22 mg
Auswaage	3,548 mg	25,412 mg
Verlust	o,198 mg	1,61o mg
	= 5,3 %	= 5,96 %

Der mittlere Trocknungsverlust von 5,6 % liegt zwischen den berechneten Werten für 1 und für 2 Mol Kristallwasser.

Myricitrin $C_{21}H_{2o}O_{12} \cdot 1\,H_2O$: Molgewicht 482,4
Kristallwassergehalt 3,73 %

$C_{21}H_{20}O_{12} \cdot 2\ H_2O$: Molgewicht 5oo,4
Kristallwassergehalt 7,2o %

In der Literatur wird für Myricitrin ein Wassergehalt von 2 Mol angegeben. (17)

Zur quantitativen Hydrolyse wurde das Glykosid mit 2 %iger Schwefelsäure 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Nach eintägigem Stehen im Kühlschrank wurde das ausgefallene Aglykon auf einer Glasfilternutsche G 3 gesammelt. Nach Konstanttrocknen bei 1oo°C in der Trockenpistole wurde gewogen.

	1. Versuch	2. Versuch
Einwaage (Glykosid)	25,79 mg	21,26 mg
Auswaage (Aglykon)	16,39 mg = 63,55 %	13,53 mg = 63,64 %

Der Mittelwert von 63,59 % Aglykon stimmt mit dem berechneten Wert überein.

Myricetin	$C_{15}H_{1o}O_8$	Molgewicht 318,23
Myricitrin	$C_{21}H_{20}O_{12} \cdot 2\ H_2O$	Molgewicht 5oo,4
Aglykonanteil des Glykosids		63,6 %

Zum Nachweis des Zuckeranteils wurde das Filtrat der Hydrolyse mit Bariumkarbonat neutralisiert und nach Filtration auf ein kleines Volumen eingeengt. Diese Lösung wurde mit einer Blutzuckerpipette auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2o43 aufgetragen. Chromatographiert wurde in Ganzglasapparaturen der Firma Hormuth & Vetter nach der absteigenden Methode. Als Laufmittel diente das Gemisch Pyridin-Essigester-Wasser (1+2+2). Die Sichtbarmachung der Flecke erfolgte durch Besprühen mit Anilinphthalatlösung. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit authentischer Rhamnose. Rhamnose : Rf o,6

Die Identifizierung des Aglykons erfolgte durch Alkalischmelze nach HÖRHAMMER und Mitarbeitern (12), sowie durch Abbau in wässerigem Alkali nach LINDSTEDT und MISIORNY (13).

Für die Alkalischmelze wurde 1 g Kaliumhydroxyd in der

Sparflamme des Bunsenbrenners im Reagenzglas geschmolzen, mit etwa 5 mg des fein verriebenen Aglykons versetzt und 5 Minuten auf Schmelztemperatur gehalten. Nach dem Abkühlen wurde die Schmelze vorsichtig mit Wasser versetzt und mit Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion angesäuert. Die Mischung wurde im Scheidetrichter 4 mal mit je 2o ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten ätherischen Lösungen wurden auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Methanol gelöst. Diese Lösung wurde für die dünnschichtchromatographische Untersuchung verwendet.

Für den wässerigen Alkaliabbau wurden etwa 5 mg des fein verriebenen Aglykons mit 5 ml einer 5o %igen Kalilauge zum Sieden erhitzt. Die Zeitdauer des Siedens wurde von 5 bis 3o Minuten variiert. Die anschließende Ausschüttelung erfolgte wie bei der Alkalischmelze.

Die Spaltprodukte wurden dünnschichtchromatographisch auf Zelluloseplatten untersucht. Die Platten wurden mit Zellulose G nach Stahl von der Firma Macherey & Nagel beschichtet. Die Schichtdicke betrug o,3 mm. Die Flecke wurden durch Besprühen mit einer Lösung von bisdiazotiertem Benzidin sichtbar gemacht. Ihre Identifizierung erfolgte durch mitgelaufene Testsubstanzen. Es ließen sich auf diese Weise Phloroglucin und Gallussäure nachweisen.

Als Laufmittel wurde verwendet:
Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) (Oberphase)

4.) Ferment und Pufferlösungen

Für die Oxydationsversuche wurde ein Trockenpräparat von Meerrettich-Peroxydase der Firma C.F.Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim verwendet. Die Aktivitätsbestimmung dieser Peroxydase erfolgte nach der von CHANCE und MAEHLY (18) angegebenen Methode. Diese Methode beruht auf der Bildung eines Gemisches von Tetrahydroxydiphenylderivaten bei der Einwirkung von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd auf Guajakol. Die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme bei 47o nm erlaubt eine Berechnung der Fermentkonzentration, da die Geschwindigkeitskonstante bekannt ist. Aus mehreren Messungen ergab sich ein Gehalt von

$6{,}9 \cdot 10^{-9}$ Mol aktiver Peroxydase/mg Trockensubstanz.

Für alle hier beschriebenen Oxydationsversuche wurden Peroxydaselösungen verwendet, die nicht älter als 5 Tage waren. Diese Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Bei dieser Aufbewahrung zeigten die Peroxydaselösungen innerhalb von 5 Tagen noch keinen Aktivitätsverlust. 10 mg Trockensubstanz wurden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

Für die Pufferlösungen wurden Substanzlösungen verwendet, die nach dem Verdünnen mit Wasser im Verhältnis 1+4 den gewünschten pH-Wert ergaben. In 100 ml Reaktionslösung waren dementsprechend 20 ml Pufferstammlösung enthalten.

Es wurden verwendet:

Für den pH 3 ein Zitrat-Salzsäurepuffer nach SÖRENSEN. (19)
Für den pH 4 und pH 5 ein Essigsäure-Azetatpuffer nach MICHAELIS. (20)
Für den pH 6 und pH 7 ein Zitronensäure-Phosphatpuffer nach MC ILVAINE. (19)

Die Kontrolle dieser Lösungen wurde mit einer Glaselektrode durchgeführt.

Das verwendete Wasser wurde durch Entmineralisieren in einem Mischbett-Ionenaustauscher und anschließendes Destillieren in einer Quarzapparatur gewonnen.

5.) <u>Die Oxydation von Myricitrin durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd</u>

a.) Myricitrinlösung für spektrophotometrische Messungen

Die Reaktionslösungen wurden hergestellt, indem 12,5 mg Myricitrin (=25 µMol) in 2 ml Methanol gelöst und mit Pufferstammlösung im Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt wurden. 20 ml dieser Lösung (=5 µMol) wurden mit der jeweils angegebenen Menge Wasserstoffperoxydlösung (5 ml n/1000 H_2O_2 = 2,5 µMol = 1 Oxydationsäquivalent) versetzt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

b.) Wasserstoffperoxydlösung

Analysenreine, etwa 3o %ige Wasserstoffperoxydlösung wurde durch Verdünnen im Verhältnis 2,8 g/25o ml Wasser auf eine Molarität von etwa o,1 gebracht. Ihr Gehalt wurde durch manganometrische Titration genau ermittelt. Durch Zugabe von Wasser wurde die Lösung auf eine Molarität von genau o,1 gebracht. Diese Stammlösung war bei Aufbewahrung im Kühlschrank mehrere Wochen ohne Wirkungsverlust haltbar und wurde für die Reaktionsansätze im Verhältnis 1:2oo verdünnt. Die so entstandene 1/1ooo normale Wasserstoffperoxydlösung enthält 2,5 µMol H_2O_2 in 5 ml.

c.) Spektralphotometer

Die photometrischen Messungen wurden mit einem Spektralphotometer der Firma Carl Zeiss, Modell PMQ II durchgeführt. Da ein Teil der Messungen im Ultraviolettbereich durchgeführt werden mußte, wurden für sämtliche Messungen Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke verwendet.

Die Vergleichsküvetten wurden jeweils mit einer der Meßlösung entsprechenden Blindlösung gefüllt, der nur die zu messende Substanz nicht zugesetzt war. Ein Teil der kinetischen Messungen wurde mit einem Beckmann-Spektralphotometer, Modell DK-1A durchgeführt. Die Aufzeichnung der Meßergebnisse erfolgt bei diesem Modell automatisch auf Koordinatenpapier. Die so erhaltenen Kurven wurden, um Vergleiche zu erleichtern, auf normales Millimeterpapier übertragen.

Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Die Meßlösungen und auch das Küvettengehäuse des Spektralphotometers wurden mit einem Thermostaten auf 25°C gebracht.

d.) Oxydationsversuche

1oo ml der gepufferten und mit der erforderlichen Menge Wasserstoffperoxyd versetzten Myricitrinlösung wurden mit 0,1 ml Peroxydaselösung durch mehrmaliges Umschütteln gemischt. Die Reaktionslösung wurde dann möglichst schnell in die Küvette überführt und im Spektralphotometer vermessen. Als Reaktionsbeginn wurde der Moment der Fermentzugabe

angenommen, die Reaktionszeit wurde mit einer Stoppuhr gemessen. Nach einiger Übung gelang es, bereits 15 bis 2o sec. nach der Fermentzugabe mit der Messung zu beginnen.

e.) Reduktionsversuche

88 mg Askorbinsäure, entsprechend 5oo µMol, wurden in Wasser zu 1oo ml gelöst. 5 ml dieser Lösung, entsprechend 25 µMol Askorbinsäure, wurden in Reagenzgläser gebracht. In einer vorbereiteten Myricitrinlösung wurde die Oxydation durch Zugabe von Ferment in Gang gebracht. Aus dieser Reaktionslösung wurde in Abständen von 3o sec. je 5 ml entnommen und zu der Askorbinsäurelösung gegeben. Bei dieser Versuchsanordnung befand sich die Askorbinsäure in einem 1oo-fachen Überschuß gegenüber 2 Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxyd. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Extinktion der reduzierten Proben bei λ 345 nm gemessen. Die erhaltenen Werte wurden verdoppelt und auf Koordinatenpapier zu einer Kurve verbunden. Die Differenz zu den zu entsprechenden Zeiten der Reaktion gemessenen Extinktionswerten nicht reduzierter Lösungen ergab die ΔE-Kurve.

6.) Dünnschichtchromatographie der Oxydationsprodukte

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden auf Zelluloseplatten vorgenommen. Als Adsorbens diente Zellulose G nach Stahl von der Firma Macherey & Nagel, das in einer Schichtdicke von o,3 mm mit einem Desaga-Streichgerät auf Glasplatten gestrichen wurde. Als Laufmittel dienten die Mischungen Chloroform-Essigester-Ameisensäure (5+4+2) und die obere Phase des Gemisches Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5).

Die Platten wurden entweder mit 3 %iger methanolischer Aluminiumchloridlösung besprüht und anschließend im UV-Licht betrachtet, oder die Flecke wurden durch Besprühen mit bisdiazotierter Benzidinlösung sichtbar gemacht. Wir bevorzugten das zweite der genannten Sprühreagenzien, da die einzelnen Substanzen sich durch die entstehenden Färbungen in charakteristischer Weise unterschieden.

Reaktionsansätze

Um die aufzutragenden Lösungsmittelmengen möglichst gering zu halten, wurde die Konzentration der Myricitrinlösung so gewählt, daß o,ol ml der Lösung lo µg enthielten.

Dazu wurden lo mg Glykosid (2o µMol) in 1 ml Methanol gelöst und nach Zusatz von 5 ml der Pufferstammlösung mit der entsprechenden Menge Wasserstoffperoxydlösung versetzt. Die Lösung wurde dann in einem lo ml Meßkolben mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Für die Wasserstoffperoxydlösung wurde die o,1 molare Stammlösung im Verhältnis 1:5 verdünnt; o,5 ml dieser Lösung entsprechen dann 1 Oxydationsäquivalent. Die Pufferlösungen waren die gleichen wie bei den spektrophotometrischen Untersuchungen.

Für die anorganische Oxydation wurden 658 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) in loo ml Wasser gelöst. 1 ml dieser Lösung (6,58 mg = 2o µMol) entspricht einem Oxydationsäquivalent. Zur Oxydation wurde die oben beschriebene Glykosidlösung mit einem, mit zwei und schließlich mit drei ml der Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung versetzt. Die anorganische Oxydation wurde in ungepufferter Lösung ohne Zusatz von Wasserstoffperoxyd vorgenommen.

Zur Oxydation mit Polyphenoloxydase wurden ebenfalls lo mg Myricitrin (2o µMol) zu lo ml gelöst. Dieser Lösung wurden etwa 5o mg Brenzkatechin zugesetzt und die Reaktion durch Zugabe einer Lösung von Polyphenoloxydase und durch Einblasen von Luft eingeleitet. Die Herstellung der Polyphenoloxydase erfolgte aus frischen Kartoffeln durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat und Azeton nach einer modifizierten Vorschrift nach KUBOWITZ (21), (22). Die Oxydation wurde in ungepufferter Lösung vorgenommen.

7.) Isolierung des Oxydationsproduktes

3 g Myricitrin wurden in Anteilen von je 1 g oxydiert. Dazu wurde 1 g Myricitrin (= 2 mMol) in 5o ml Methanol gelöst und mit Wasser auf ein Volumen von 2 l verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 2o ml (= 2 mMol) der 1/1o molaren Wasserstoffperoxydlösung gegeben. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 2o ml der Peroxydaselösung gestartet. Einige Minuten nach der Fermentzugabe färbte sich der Ansatz dunkel. Nach einstündigem Stehen wurde das Wasser im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand war eine gelbbraune, trockene Masse, die zur Abtrennung von Fermentresten in Methanol aufgenommen wurde. Wegen der außerordentlich guten Löslichkeit des oxydierten Glykosids in Wasser, Methanol und Äthanol gelang es nicht, das Produkt durch Kristallisation zu reinigen. Durch Ausfällen mit Äther aus einer methanolischen Lösung erhielten wir ein gelbes Produkt, das sich als chromatographisch einheitlich erwies. Bei einer Schmelzpunktbestimmung trat oberhalb von 18o°C Braunfärbung und Zersetzung ein.

Das oxydierte Glykosid wurde hydrolysiert. Dazu wurde die Substanz in 2 %iger Schwefelsäure auf dem Wasserbad 1 Stunde erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das ausgefallene Aglykon auf Glasfilternutschen gesammelt und durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Wasser gereinigt. Der Schmelzpunkt betrug 256°C (Kofler). Wir erhielten so 86o mg einer gelben, kristallinen Substanz.

8.) Untersuchung des Oxydationsproduktes

a.) Schmelzpunktbestimmung und Chromatographie

Der Schmelzpunkt des Aglykons des Oxydationsproduktes wurde mit dem Kofler-Heiztischmikroskop bestimmt. Als Mittelwert aus mehreren Messungen ergab sich ein Schmelzpunkt von 256°C.

Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden die bereits beschriebenen Zelluloseplatten verwendet. Als Laufmittel wurden benutzt:
Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) (Oberphase) und
Chloroform-Essigester-Ameisensäure (5+4+2).

b.) Elementaranalyse +)

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

	Einwaage (mg)	CO_2 (mg)	H_2O (mg)	%C	%H
1.	3,754	7,61	1,13	55,32	3,37
2.	3,895	7,86	1,17	55,06	3,36
Mittelwert:				55,19	3,365

Für ein dimeres Myricetin wurden folgende Werte berechnet:

Myricetin $C_{15}H_{10}O_8$ Molgewicht 318,2

2·Myricetin -2H $C_{30}H_{18}O_{16}$ Molgewicht 634,45

C-Gehalt: 56,79 % H-Gehalt: 2,86 %

c.) Azetylierung des Aglykons

500 mg des Aglykons wurden mit 20 ml Essigsäureanhydrid und 2 g wasserfreiem Natriumazetat 1 Stunde am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 20 ml Wasser versetzt und zur Kristallisation 24 Stunden

+) ausgeführt vom Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr.

in den Kühlschrank gestellt. Die abgeschiedenen Kristalle wurden auf einer Glasfilternutsche gesammelt und mehrmals aus Methanol umkristallisiert. Die erhaltenen feinen Kristalle waren weiß und schmolzen bei 286°C (Kofler).

d.) Azetylgruppenbestimmung

Die Azetylgruppenbestimmung ergab folgende Werte:

Verseifung mit Chromschwefelsäure +)

	Einwaage (mg)	verbrauchte ml n/1oo NaOH	% CH_3CO
1.	4,o22	3,92	41,95
2.	5,994	6,o6	43,51

Für 12 Azetylgruppen wurden folgende Werte berechnet:
Azetyliertes Aglykon $C_{54}H_{42}O_{28}$ Molgewicht 1138,9
Gehalt CH_3CO: 45,36 %

Die berechneten Werte für 11 Azetylgruppen betragen:
Gehalt CH_3CO: 43,16 %
Gehalt CH_3: 15,o9 %
Azetyliertes Aglykon $C_{52}H_{4o}O_{27}$ Molgewicht 1o96,9

C-Methylgruppenbestimmung +)

	Einwaage (mg)	verbrauchte ml n/1oo NaOH	% CH_3
1.	9,161	1o,35	16,98
2.	12,481	12,57	15,14

e.) Elementaranalyse des azetylierten Aglykons

Die Elementaranalyse +) ergab folgende Werte:

+) ausgeführt vom Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr

	Einwaage (mg)	CO_2 (mg)	H_2O (mg)	% C	%H
1.	4,287	8,87	1,41	56,46	3,68
2.	4,633	9,61	1,61	56,61	3,89
Mittelwert:				56,53	3,78

Die berechneten Werte betragen:
Azetyliertes Aglykon $C_{54}H_{42}O_{28}$ Molgewicht 1138,9
C-Gehalt: 56,95 %
H-Gehalt: 3,71 %

f.) Molekulargewichtsbestimmungen

Für die Molekulargewichtsbestimmungen wurde ein Dampfdruckosmometer der Firma Mechrolab benutzt. Als Lösungsmittel für alle Bestimmungen wurde Azeton verwendet.

Für das Aglykon des Oxydationsproduktes ergab sich ein Molekulargewicht von 695.
Berechneter Wert 634,45
Für das azetylierte Aglykon wurde 1150 gefunden.
Berechneter Wert 1138,9

g.) UV-Spektren

Für die Aluminiumkomplexe wurden 2,5 g Myricitrin, bzw. glykosidisches Oxydationsprodukt in wenig Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wurde im Meßkolben jeweils 1 ml einer 3 %igen methanolischen Aluminiumchloridlösung gegeben. Die Mischung wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 ml mit Methanol aufgefüllt. Nach einstündigem Stehen wurde dann das Spektrum bestimmt. 1 ml der Aluminiumchloridlösung enthält 124 µMol $AlCl_3$, entsprechend einem 25-fachen molaren Überschuß. Das Myricitrin sowie das Oxydationsprodukt wurden vor der Bestimmung im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

h.) Alkaliabbau des Oxydationsproduktes

Etwa 10 mg Aglykon wurden mit 10 ml einer frisch bereiteten 50 %igen Kalilauge zum Sieden erhitzt. Die Dauer des Siedens wurde in dem Bereich von 5 bis 30 Minuten variiert. Nach dem

Abkühlen wurde die Mischung mit Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und anschließend viermal mit je 2o ml Äther ausgeschüttelt. Durch Vorversuche war sichergestellt worden, daß unter diesen Bedingungen Ellagsäure in chromatographisch nachweisbaren Mengen in den Äther geht. Die vereinigten ätherischen Lösungen wurden auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft und der Rückstand zur Chromatographie in wenig Methanol aufgenommen. Die Identifizierung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie. Außerdem wurde ein Alkaliabbau durch Schmelzen mit Kaliumhydroxyd durchgeführt. Die Methodik wurde bereits auf Seite 36 beschrieben.

ZUSAMMENFASSUNG

Die fermentative Oxydation von Myricitrin, einem weitverbreiteten Flavonolglykosid, durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd wurde untersucht.

Das Glykosid wurde im pH-Bereich von 3 bis 7 oxydiert. Der Verlauf der Reaktion wurde spektrophotometrisch und chromatographisch beobachtet. Dabei zeigte es sich, daß bei Anwendung von 2 Oxydationsäquivalenten ein stabiles Oxydationsprodukt entsteht, das durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd nicht weiter oxydiert wird. Im gesamten untersuchten pH-Bereich entsteht dasselbe Oxydationsprodukt. Mit steigendem pH-Wert verläuft die Reaktion schneller.

Aus den chromatographischen und spektrophotometrischen Untersuchungen schließen wir, daß zunächst ein Intermediärprodukt mit chinoider Struktur gebildet wird, das unbeständig ist und dimerisiert. Das dabei gebildete Dimere haben wir isoliert und seine Molekülgröße durch Molgewichtsbestimmung sichergestellt. Das Spektrum des Aglykons des Oxydationsproduktes hat eine deutliche Ähnlichkeit zum Myricetin-Spektrum, so daß die Flavonstruktur im wesentlichen erhalten geblieben sein muß. Hierfür spricht auch das Spektrum des Aluminium-Komplexes des glykosidischen Produktes. Die Ergebnisse des Alkaliabbaus lassen darauf schließen, daß die Verknüpfung der beiden Ausgangsmoleküle zum Dimeren zwischen den Seitenringen erfolgt ist.

LITERATUR-VERZEICHNIS

(1) K. FREUDENBERG und K. WEINGES, in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe", 16. Band, S. 5-7 herausgegeben von L. Zechmeister, Wien, Springer-Verlag 1958

(2) D. E. HATHWAY, Biochem. J. 7o, 34 (1956)

(3) D. E. HATHWAY, und J.W.T. SEAKINS, Biochem. J. 67, 239 (1957)

(4) O. TH. SCHMIDT, in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe", 13. Band, S. 126 ff. herausgegeben von L. Zechmeister, Wien, Springer-Verlag 1956

(5) P. DUQUENOIS, Pharmac. Weekblad, 93, 89 (1958)

(6) C. NEUBERG und M. KOBEL, Enzymologia, 1, 177 (1936/37)

(7) M. K. MIKHAILOW, Doklady, 121, 511 (1958)

(8) H. LOTH, Arch. Pharmaz., 294, 419 (1961)

(9) H. LOTH und D. KLINGE, Arch. Pharmaz., 297, 165 (1964)

(10) H. LOTH, Arch. Pharmaz., 295, 161 (1962)

(11) H. IMAGAWA und Y. TAKINO, Agr. Biol. Chem.(Tokyo) 26, 541 (1962)

(12) L. HÖRHAMMER, L. STICH und H. WAGNER, Arch. Pharmaz., 294, 685 (1961)

(13) . LINDSTEDT und . MISIORNY, Act. Chem. Scand., 5, 1 (1951)

(14) L. JURD, in "The Chemistry of Flavonoid Compounds", herausgegeben von T. A. Geissmann, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1962

(15) L. HORNER und W. DÜRCKHEIMER, Z. f. Naturfschg., 14b, 741 (1959)

(16) R. HÄNSEL und L. HÖRHAMMER, Arch. Pharmaz., 287, 117 (1953)

(17) Merck Index, 7. Ausgabe, S. 699, veröffentlicht von Merck & Co. Inc. Rahway, N. J. USA 196o

(18) B. CHANCE und A. C. MAEHLY in "Methods in Enzymology", Band II, S. 77o, herausgegeben von S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955

(19) J. D'Ans und E. Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949

(20) M. STEINER, in "Methoden der Fermentforschung", Band I, S. 761, herausgegeben von E. Bamann und K. Myrbäck, Verlag Georg Thieme, Leipzig 1941

(21) F. KUBOWITZ, Biochem. Z. 292, 221 (1937)

(22) F. KUBOWITZ, Biochem. Z. 299, 32 (1938)

Lebenslauf

Ich wurde am 3. Juli 1933 als Sohn des Apothekers Dr. Günther Heinrici und seiner Ehefrau Erika, geb. Schäfer, in Halle an der Saale geboren. Ich besuchte zunächst die Grundschule und später die Latina der Franckeschen Stiftungen zu Halle. Im Jahre 1953 bestand ich die Reifeprüfung an der Paul-Natorp-Schule in Berlin.

Von 1953 bis 1955 war ich Praktikant in der Oker-Apotheke in Berlin-Neukölln. Im September 1955 bestand ich mein Vorexamen und begann 1956 mein Studium an der Freien Universität Berlin, das ich im Juli 1959 mit dem Staatsexamen abschloß.

Zum gleichen Zeitpunkt begann ich mit meiner Doktorarbeit am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin. Seit März 1963 bin ich mit der Wahrnehmung der Geschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

Photodruck der Photo Copie